

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFER PENDIUK GONÇALVES

AÇÃO DE COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO DA PELE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO OS MODELOS DE
INCISÃO SUTURADA E EXCISÃO DA PELE

CURITIBA

2013

JENIFER PENDIUK GONÇALVES

AÇÃO DE COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO DA PELE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO OS MODELOS DE
INCISÃO SUTURADA E EXCISÃO DA PELE

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas – Bacharelado com ênfase em Processos Moleculares, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Camargo de Oliveira

Coorientadora: Prof^a Dr^a Dorly de Freitas Buchi

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente meus pais, Almeri e Jeferson, minha irmã Andressa e minha avó Nilza, que sempre me deram muito amor e apoio em todas as decisões que tomei. Obrigada por compreenderem a nossa distância e reclamar só as vezes que eu nunca vou para casa e só fico no laboratório!

Ao Gustavo, meu namorado e melhor amigo, por estar sempre ao meu lado, me fazendo sorrir quando estou feliz e também quando quero chorar. Obrigada pelo seu companheirismo.

À Caro, por me orientar oficialmente durante a monografia e extraoficialmente há 3 anos, por ser tão sutil quanto uma pedra jogada no lago e ao mesmo tempo sempre sorridente e disposta a fazer de tudo para me ajudar!

À Dorly, por ser minha orientadora desde 2009. Agradeço por todo o amadurecimento profissional e pessoal durante este tempo.

À Mone, por ser minha terceira orientadora, sempre palpitando nos projetos e dando ótimos conselhos.

Aos outros professores do nosso grupo, Edvaldo e Célia, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof Edison Luiz Prisco Farias, que me ensinou a executar o modelo de incisão na pele e continua contribuindo para o trabalho.

À Dra. Eugénia Carvalho, da Universidade de Coimbra, Portugal, e todo o pessoal do seu grupo de pesquisa, que me receberam de portas abertas e me ensinaram a executar o modelo de excisão da pele.

Ao Cléber, o que seria de mim sem sua ajuda histológica?! Muito obrigada pela disponibilidade e eficiência!

À Malu, a estagiária mais produtiva de todos os tempos, por estar sempre ao meu lado, me elogiando e me ajudando em tudo!

A todas as outras pessoas do lab que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho ou que simplesmente estiveram por perto dando apoio moral, dos quais não vou citar nomes porque minha memória é péssima e não gostaria de esquecer de ninguém!

À Bia, com quem eu morei ao longo desse ano, que me esperava com a janta pronta e uma boa e longa conversa para relaxar a cabeça!

Ao Seu Nino, pela disponibilidade em solucionar dúvidas de histologia!

A todo o pessoal do Biotério, em especial Iselen, Gilmara e Luana, pela atenção e disponibilidade.

À Alessandra e ao Israel, por escanearem minhas lâminas.

À Farmácia de Manipulação Homeoterápica, pela confecção dos medicamentos.

À banca avaliadora, Prof^a Dra. Daniela de Almeida Cabrini e Prof^a Dra. Sonia Regina Grötzner, por aceitarem prontamente corrigir minha monografia. Em especial, à Soninha, por ser minha primeira orientadora e me tratar sempre com tanto carinho!

Aos camundongos, as estrelas deste trabalho!

A todas as agências financiadoras, em especial ao CNPq, que me concedeu a bolsa de iniciação científica em paralelo com o desenvolvimento da monografia.

RESUMO

A pele é o maior órgão do nosso corpo e serve como uma barreira contra agressões externas. Ela é estruturalmente organizada em duas camadas: epiderme e derme, respectivamente de fora para dentro. Cicatrização é um processo fisiológico dinâmico e complexo que representa a resposta do organismo frente a lesões. Esse processo é dividido em quatro fases que se complementam e se sobrepõem espacial e temporalmente: hemostase, inflamatória, proliferativa e de remodelação. Os complexos naturais altamente diluídos compreendem uma combinação de vários compostos diferentes tidos como úteis para determinados sintomas ou doença. A utilização de altas diluições de compostos naturais vem crescendo, fazendo necessários estudos que comprovem sua eficácia e segurança. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo verificar os efeitos do complexo natural altamente diluído denominado M1, administrado topicamente em forma de gel, sobre o processo de cicatrização da pele em camundongos utilizando dois modelos, o de incisão suturada com fio absorvível ou não absorvível e o de excisão da pele. No primeiro modelo, foi feita uma incisão longitudinal no dorso de camundongos, a qual foi suturada com fio absorvível ou não absorvível. Os animais foram tratados topicamente com gel de carbopol contendo 10% de M1 ou não (controle), por 3 dias consecutivos. A pele do local da incisão foi coletada e processada para histologia com coloração tricrômico de Gomori a fim de verificar a reepitelialização e migração do tecido conjuntivo. No modelo de excisão, foram induzidas duas feridas circulares no dorso dos camundongos, as quais foram tratadas topicamente com gel contendo M1 ou não, por 10 dias consecutivos e medidas nos dias 0, 3, 7 e 10 a fim de obter a curva de fechamento das feridas. No modelo de incisão, os animais suturados com fio absorvível e tratados por 3 dias com M1 não mostraram diferenças no número de cortes histológicos que apresentaram epiderme fechada, nem nas áreas de epiderme e tecido conjuntivo. Já os animais suturados com fio não absorvível e tratados com M1 mostraram maior número de cortes com epiderme fechada quando comparados aos controles, porém não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na quantificação das áreas de epiderme e tecido conjuntivo. O fechamento da ferida e a qualidade da cicatrização variaram consideravelmente de acordo com a forma que os pontos eram feitos, dificultando as análises desse modelo. Quando utilizamos o modelo de excisão da pele não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e M1 ao longo de 10 dias no que diz respeito à velocidade de fechamento da ferida. Concluimos, portanto, que o tratamento tópico com M1 na forma de gel não alterou significativamente o fechamento da epiderme e do tecido conjuntivo subjacente no modelo de incisão e sutura da pele, sendo que a metodologia empregada nesse modelo não foi a ideal para o estudo do processo de cicatrização da pele em camundongos. E também o tratamento com M1 não alterou significativamente a velocidade de fechamento da ferida no modelo de excisão da pele.

Palavras-chave: pele, cicatrização, complexo natural altamente diluído.

ABSTRACT

Skin is the body largest organ and serves as a barrier against external damage. It is structurally organized in two layers: epidermis, and dermis, respectively from outside to inside. Wound healing is a dynamic and complex physiological process that represents the organism response to injuries. This process is divided into four phases that complement and overlap spatially and temporally: hemostasis, inflammatory, proliferative, and remodeling. Natural complexes highly diluted comprise a combination of several different compounds regarded as useful for certain symptoms or disease. The use of natural compounds in high dilutions is growing, so more studies are needed to confirm its efficacy and safety. Thus, this study aims to determine the effects of a highly diluted natural complex called M1 administered topically in a gel formulation on mice skin wound healing process using two models: skin incision followed by suture with absorbable or non-absorbable thread and skin excision. In the first model a longitudinal incision was made on mice dorsum and sutured with absorbable or non-absorbable threads. Animals were treated topically with carbopol gel containing 10% M1 or not (control) for 3 consecutive days. The skin incision site was collected and processed for histology with Gomori's trichrome staining to verify reepithelialization and connective tissue migration. Two circular wounds were induced on the backs of mice in the excision model, and treated topically with gel containing M1 or not for 10 consecutive days. Wounds were measured on days 0, 3, 7 and 10 to obtain the wounds closing curve. In the incision model the animals sutured with absorbable thread and treated for 3 days with M1 showed no differences in the number of histological sections that showed completely closed epidermis or in the areas of connective tissue and epidermis. Animals sutured with non-absorbable thread and treated with M1 showed enhanced amount of histological sections with closed epidermis when compared to controls, but no statistically significant differences in the quantification of epidermis and connective tissue areas. Wound closure and quality varied considerably according to the way the sutures were made then complicating the analysis of this model. When using the skin excision model no statistically significant differences were detected between control and M1 group over 10 days regarded to wound closure rate. We therefore conclude that topical treatment with M1 gel did not significantly alter the closure of epidermis and the underlying connective tissue using the skin incision and suture model, as well as the methodology used in this model was not ideal for the study of skin wound healing process in mice. And also, M1 treatment did not significantly alter the rate of wound closure in the skin excision model.

Key words: skin, wound healing, highly diluted natural complex.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DO APARECIMENTO DE DIFERENTES CÉLULAS NO LOCAL DA FERIDA.....	6
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO..	8
FIGURA 3. ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	15
FIGURA 4. MODELO DE INCISÃO E SUTURA DA PELE.....	16
FIGURA 5. MODELO DE EXCISÃO DA PELE.	18
FIGURA 6. DELIMITAÇÃO DA ÁREA DA EXCISÃO.....	18
FIGURA 7. FOTOGRAFIA DA ÁREA ABERTA DA FERIDA.....	19
FIGURA 8. ANÁLISE DA PELE ATRAVÉS DE SOFTWARE IMAGEJ..	20
FIGURA 9. ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE APÓS INCISÃO E SUTURA.....	23
FIGURA 10. MEDIDAS DA PELE APÓS OS ENSAIOS DE INCISÃO E SUTURA...25	
FIGURA 11. FERIDA ABERTA APÓS EXCISÃO DA PELE.....	27
FIGURA 12. FECHAMENTO DA FERIDA APÓS EXCISÃO DA PELE.....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
ESTRUTURA DA PELE	4
O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE	5
COMPOSTOS E COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS	8
2. OBJETIVOS	12
OBJETIVO GERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
PREPARAÇÃO DO COMPLEXO M1	13
ANIMAIS	14
PARTE 1 - MODELO DE INCISÃO E SUTURA DA PELE	15
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	17
PARTE 2 - MODELO DE EXCISÃO DA PELE	17
ANÁLISES DE IMAGENS	19
ÁREA DA EPIDERME E DO TECIDO CONJUNTIVO – MODELO DE INCISÃO NA PELE	19
DETERMINAÇÃO DA ÁREA ABERTA DAS FERIDAS – MODELO DE EXCISÃO DA PELE	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
PARTE 1 - MODELO DE INCISÃO SUTURADA	22
PARTE 2 - MODELO DE EXCISÃO DA PELE	27
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ANEXOS	37
ANEXO 1- PROTOCOLOS PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DA PELE	37
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE MANIPULAÇÃO ANIMAL	39
ANEXO 3 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA/UFPR	39

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ESTRUTURA DA PELE

A pele é um órgão complexo que cobre toda a superfície do nosso corpo, constituindo aproximadamente 15% do peso corporal total, sendo sem dúvida o nosso maior órgão. Ela exerce diversas funções vitais ao organismo. A principal é servir como barreira protetora contra agressões físicas como perda excessiva de água. Além disso age como barreira química e biológica contra infecções por patógenos por exemplo (KANITAKIS, 2002). Ela é também um dos órgãos mais facilmente atingidos por lesões, uma vez que constitui a primeira interface entre o corpo e o ambiente externo, encontrando-se sob constante agressão por parte de patógenos, traumas e radiação UV, assim como também é local comum para aparecimento de tumores (MACLEOD; HAVRAN, 2011). A espessura dessa barreira protetora varia consideravelmente de acordo com o local do corpo no qual se encontra (COMBADIÈRE; LIARD, 2011).

A pele é estruturalmente organizada em duas camadas sobrepostas: epiderme e derme, de fora para dentro, respectivamente. A **epiderme** é um epitélio estratificado que se renova continuamente, sendo constituída em sua maioria (cerca de 80% de todas as células epidérmicas) por queratinócitos. Esses originam-se de células tronco localizadas na camada mais profunda da epiderme e migram até a superfície da pele enquanto passam por transformações morfológicas e bioquímicas. Os queratinócitos morrem por processo apoptótico altamente especializado e são eliminados por descamação. Fazem parte também das células epidérmicas os melanócitos, células com função imunológica e células nervosas. A epiderme não é vascularizada, isto é, não contém vasos sanguíneos nem linfáticos e está conectada à derme por membrana basal sintetizada pelos queratinócitos da epiderme e pelos fibroblastos da derme, a qual é composta por colágeno tipo IV, glicoproteínas estruturais e proteoglicanos. Essa camada tem função adesiva para a epiderme e serve também como suporte para a migração dos queratinócitos durante o processo de cicatrização. Abaixo se encontra a **derme**, que é um tecido conectivo de suporte elástico e compressível. Essa camada da pele possui vários tipos celulares, como fibroblastos (responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular) e

células imunológicas; vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas; fibras de colágeno dos tipos I e III organizadas frouxamente em feixes, as quais conferem resistência mecânica à pele; finas fibras elásticas responsáveis pela elasticidade do tecido; e ainda substância fundamental formada por macromoléculas (glicoproteínas e proteoglicanos) que preenchem o espaço entre os outros componentes da derme.

Abaixo da pele, encontra-se a hipoderme, que é formada por tecido conjuntivo, podendo apresentar quantidade variável de tecido adiposo. Tem papel importante na termorregulação, estoque de nutrientes e proteção mecânica. O principal componente celular dessa camada são os adipócitos, células redondas com citoplasma rico em ácidos graxos que comprimem o núcleo celular próximo à membrana plasmática (revisado por COMBADIÈRE; LIARD, 2011; KANITAKIS, 2002).

A pele apresenta ainda alguns apêndices, que resultam de interações entre a derme e a epiderme como, por exemplo, as glândulas sebáceas e sudoríparas (invaginações) e os pelos e unhas (saliências) (WIDELITZ *et al.*, 1997).

O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE

O que chamamos de cicatrização é um processo fisiológico dinâmico e complexo que representa a resposta do organismo frente a lesões (AMADEU *et al.*, 2008).

O processo de cicatrização da pele é geralmente organizado em quatro fases que se complementam e muitas vezes se sobrepõem umas as outras em vários aspectos (WILGUS, 2008):

1º) **Hemostase** é a fase inicial da cicatrização, tendo início segundos ou minutos após a injúria. Danos aos vasos sanguíneos provocam hemorragia no local, expondo plaquetas, as quais liberam dos seus grânulos grandes quantidades de fatores de crescimento, mediadores da cascata de coagulação e outras citocinas. A ativação da cascata de coagulação induz a formação de tampão de fibrina, oferecendo matriz extracelular provisória para migração celular e deposição de nova matriz (SANTORO; GAUDINO, 2005; TSIROGIANNI *et al.*, 2006).

Os diversos fatores liberados pelas plaquetas, como os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), derivado de plaquetas (PDGF) e os

semelhantes à insulina (IGFs); iniciam o reparo do tecido recrutando células do sistema imunológico e promovendo sua diferenciação e ativação (GREENHALGH, 1998; AMADEU *et al.*, 2008; MACLEOD; HAVRAN, 2011).

Ao final dessa fase, a histamina liberada pelos mastócitos provoca a dilatação dos vasos sanguíneos, tornando-os porosos, o que favorece a passagem de células inflamatórias através de suas paredes de forma a atingirem o local da lesão, iniciando a próxima fase do processo (DELAVERY *et al.*, 2011).

2º) A fase **inflamatória** tem papel central na cicatrização, não apenas por eliminar organismos invasores, mas também participando ativamente nos processos de reparo do tecido (TSIROGIANNI *et al.*, 2006). Esse processo inflamatório tem início logo após o surgimento de uma lesão e cessa com a completa cicatrização da mesma (NISHIO *et al.*, 2009). As células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos apresentam influxo mais abundante nos estágios iniciais (Figura 1), quando as prioridades são a hemostase e a limpeza do local, evitando infecções.

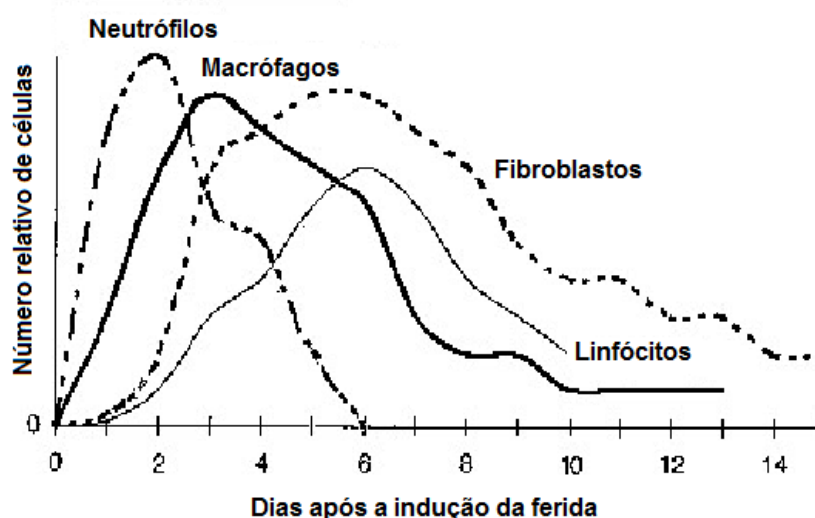


Figura 1. Esquema do aparecimento de diferentes células no local da ferida. Neutrófilos e macrófagos predominam na fase inflamatória, os linfócitos aparecem logo depois, enquanto fibroblastos predominam durante a fase proliferativa. Fonte: adaptado de (WITTE; BARBUL, 1997).

Os neutrófilos são os primeiros a chegar ao local da injúria e logo são seguidos pelos macrófagos, os quais são atraídos pelos produtos da apoptose dos primeiros. Essas células fagocíticas desempenham o importante papel de eliminar não só bactérias, mas também os restos celulares da ferida. Os patógenos são reconhecidos por receptores de superfície presentes nas células fagocíticas e, depois de internalizados, são expostos a espécies reativas derivadas do oxigênio e enzimas lisossomais. Já os macrófagos chegam ao local aproximadamente 48h

após o aparecimento da lesão e permanecem até a conclusão da fase inflamatória (GANTWERKER; HOM, 2012). Eventualmente, linfócitos T e outras células do sistema imunológico adaptativo podem estar envolvidos em estágios mais tardios no combate a patógenos específicos.

A presença das células inflamatórias no local da lesão é de fundamental importância no combate aos patógenos, porém a persistência dessa fase pode levar a uma ferida crônica.

3º) As moléculas sinalizadoras liberadas pelas células inflamatórias atraem fibroblastos e miofibroblastos para o local da ferida, iniciando a fase **proliferativa** ou formação do **tecido de granulação** e a deposição de colágeno e glicosaminoglicanos. É nessa altura que a derme começa a ganhar volume (DELAVERY *et al.*, 2011). Os fibroblastos são as células responsáveis pela síntese de todas as moléculas fibrilares da derme e também dos constituintes da substância fundamental (KANITAKIS, 2002).

Novos vasos sanguíneos são criados para suprir com nutrientes, oxigênio e novas células a área em regeneração. Começa também a síntese de matriz extracelular de forma a reconstruir o tecido danificado. Os miofibroblastos gerados nessa fase, principalmente a partir de fibroblastos, contêm filamentos contráteis intracelulares, exercendo a força mecânica necessária para o fechamento da ferida (AMADEU *et al.*, 2008).

A chegada de queratinócitos nas margens da ferida, seguido da sua proliferação, estimulada por fatores de crescimento e também pela ausência de células na vizinhança ou margem da ferida, em direção ao centro da lesão promove a reepitelialização, isolando a ferida do contato com o meio externo. Quando este processo ocorre rapidamente, a restauração das funções da pele também é rápida, ocorrendo conseqüentemente uma redução da morbidade e mortalidade do paciente (EPSTEIN, 1999; AMADEU *et al.*, 2008).

4º) Após reepitelialização completa tem início a fase de **remodelação**, que é quando a matriz provisória de colágeno tipo III é degradada por metaloproteases e substituída por colágeno tipo I e as células participantes das fases anteriores sofrem apoptose. Portanto, o tecido de granulação é substituído por uma cicatriz (AMADEU *et al.*, 2008). Essa fase tem início alguns dias após o surgimento da lesão e pode levar mais de dois anos para ser concluída (SCHREML *et al.*, 2010).

O sucesso dessa última fase envolve um balanço delicado, uma vez que a síntese de colágeno continua, porém também se acentua a produção de collagenase, de forma a estabelecer um equilíbrio entre a síntese e a degradação desta proteína (GANTWERKER; HOM, 2012). Com o tempo o tecido no local da lesão torna-se menos celular e vascular e mais fibroso.

Para que o processo de cicatrização da pele decorra normalmente as fases descritas anteriormente devem ser rigorosamente coordenadas, espacial e temporalmente (AMADEU *et al.*, 2008).

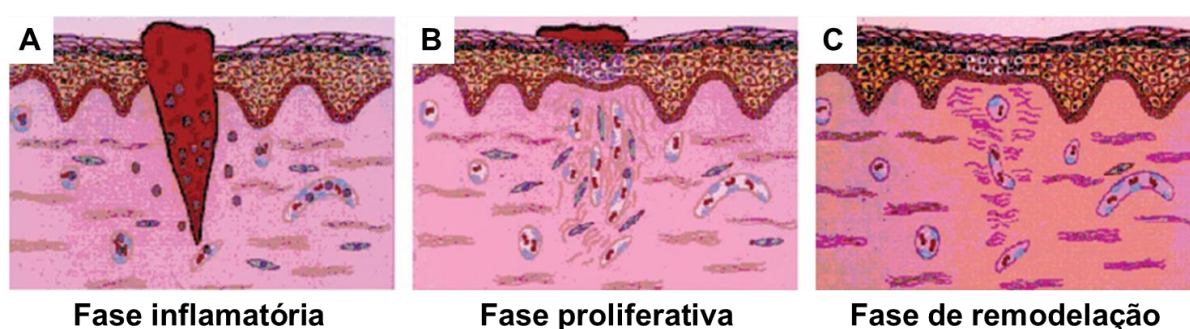


Figura 2. Representação esquemática das fases do processo de cicatrização. (A) Infiltração de neutrófilos no local da lesão. (B) Fechamento do epitélio devido à proliferação dos queratinócitos. (C) Desaparecimento dos fibroblastos e capilares formados nas fases anteriores. Fonte: adaptado de (BOATENG *et al.*, 2008).

COMPOSTOS E COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS

A homeopatia nasceu no ano de 1796, criada pelo médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann. A ciência homeopática é baseada em conceitos bastante sólidos, como a “Lei da Semelhança”, “A Experimentação no homem São”, “O Uso de Doses Mínimas ou Infinitesimais” e “O Uso do Medicamento Único”. A diluição e a dinamização das soluções foram estabelecidas por Hahnemann com o intuito de diminuir a toxicidade das substâncias utilizadas e liberar a força medicamentosa latente das mesmas (“Farmacopeia Homeopática Brasileira,” 2011).

Contrariamente ao que acontece com medicamentos alopáticos, a homeopatia vem sendo comercializada e utilizada há mais de duzentos anos, sem que haja estudos científicos prévios a respeito da eficácia e segurança desses produtos. O fato de se tratar de compostos altamente diluídos não assegura a segurança e ausência de efeitos colaterais durante o uso. Desta forma, destaca-se a importância de estudar de forma séria e controlada os efeitos dos compostos e

complexos naturais altamente diluídos utilizando o método científico em diferentes modelos biológicos, como animais e cultura de células, por exemplo, afim de obter bases para a consolidação da homeopatia no âmbito científico.

O nosso grupo de pesquisa utiliza a denominação “altamente diluído” para as soluções previamente chamadas de “homeopáticas”. Esse termo foi estabelecido pelo Grupo Internacional de Pesquisa em Infinitesimal (GIRI) e a partir de então foi padronizado para os pesquisadores membros dessa comunidade (WAISSE, 2012). Portanto, denominamos “composto natural altamente diluído” as soluções compostas por apenas um composto (por exemplo, *Atropa belladonna* CH200) e “complexo natural altamente diluído” as soluções constituídas por uma mistura de vários compostos, não necessariamente na mesma potência. Alguns complexos naturais altamente diluídos vêm sendo testados pelo nosso grupo há alguns anos, dentre eles o que denominamos M1, que é objeto de estudo deste trabalho.

Dentro da linha de pesquisa em células inflamatórias e neoplásicas têm sido desenvolvidos vários projetos com a finalidade de avaliar a atividade e os possíveis mecanismos de ação dos compostos e complexo naturais altamente diluídos como modificadores da resposta biológica. Atualmente a atenção de cientistas e da indústria farmacêutica mundial está dirigida a novas formas de terapias imunomoduladoras, as quais são dirigidas a células específicas ou às citocinas que contribuem para a resposta imunológica e ficaram conhecidas como “modificadores da resposta biológica”.

A eficácia de altas diluições de substâncias biologicamente ativas na modificação da resposta imunológica tem sido avaliada através de diferentes abordagens teóricas e experimentais. Estudos anteriores do Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas mostraram efeito ativador do tratamento *in vitro* com complexos naturais altamente diluídos sobre células da linhagem monocítica, que inclui monócitos e macrófagos, os quais quando tratados apresentam maior espriamento, estimulação do sistema endocítico/fagocítico, produção elevada de IFN- γ e IL-4, espécies reativas derivadas do oxigênio e óxido nítrico, e são capazes de estimular a proliferação de linfócitos (LOPES *et al.*, 2006; OLIVEIRA, DE *et al.*, 2006; BURBANO *et al.*, 2009).

De Oliveira *et al.* (2011) mostraram diminuição da produção de IFN- γ e TNF- α por macrófagos estimulados *in vitro* por lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com M1, o mesmo complexo natural altamente diluído utilizado no presente trabalho.

Viram ainda que o tratamento *in vivo* com M1 aumentou a produção de óxido nítrico, assim como diminuiu a de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por parte dos macrófagos peritoneais. O tratamento *in vivo* foi também capaz de aumentar a quantidade de monócitos/macrófagos, linfócitos B e granulócitos na medula óssea, assim como monócitos e linfócitos B nos linfonodos. Esses dados mostram ação geral do M1 no sistema imunológico, melhorando a imunidade celular e humoral, o que propicia proteção ao organismo contra infecções, e ao mesmo tempo a modulação da resposta inflamatória, uma vez que o M1 foi capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias quando simulada uma infecção, sem citotoxicidade para os macrófagos (OLIVEIRA, DE *et al.*, 2011).

Os complexos naturais altamente diluídos compreendem uma combinação de vários compostos diferentes tidos como úteis para determinados sintomas ou doença. Observações clínicas confirmam o sucesso desse tratamento que aparenta permitir que o próprio organismo responda positivamente a diversas condições patológicas. Compostos preparados seguindo técnicas homeopáticas são usados rotineiramente para tratamentos desde resfriados, febres, acne e lesões cutâneas, até enfermidades mais complexas, como infecções por patógenos e neoplasias. A capacidade desses complexos naturais altamente diluídos de modular a ativação dos macrófagos, a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio e a liberação de citocinas, que são mediadores centrais do sistema imunológico e da homeostase, nos levou à ideia de que pudessem promover alterações no processo de cicatrização da pele, uma vez que esses processos estão intimamente relacionados.

Desta forma, pela primeira vez estudando o processo de cicatrização, resultados obtidos previamente a partir de outro projeto do nosso grupo de pesquisa serviram como base e justificativa para o estudo proposto no presente trabalho. Observou-se após incisão suturada na pele dorsal dos camundongos e tratamento intraperitonealmente com 3 μ L/g de um determinado complexo natural altamente diluído por até 5 dias, que já no dia seguinte à cirurgia as incisões dos animais tratados apresentavam visualmente maior grau de cicatrização. No terceiro dia, o local da lesão apresentou maior epitelialização, infiltração de neutrófilos e reorganização do tecido conjuntivo, com aumento da quantidade de fibroblastos, quando comparado aos animais não tratados. Após 5 dias, o aspecto externo demonstrava o fechamento total da incisão apenas nos animais tratados,

apresentando histologicamente menor quantidade de fibroblastos na pele, menor neovascularização, redução da inflamação e hiper celularidade, permitindo cicatrização adequada (DIETER, 2005).

A utilização de compostos naturais no tratamento de feridas agudas e crônicas vem crescendo, não somente por parte da população em geral, mas também por profissionais da saúde. Essas terapias ditas complementares, como as altas diluições de compostos naturais, apresentam evidências de eficácia (OBERBAUM *et al.*, 1992, 1997; PREETHI; KUTTAN, 2011), melhora do bem-estar do paciente (BRINKHAUS *et al.*, 2006) e segurança, porém faltam mais estudos científicos realizados de maneira controlada que confirmem esse potencial, podendo então ser estabelecidas como terapia complementar ou mesmo padrão, uma vez que apresentam baixo custo, são bastante acessíveis e raramente são relatados eventos de hipersensibilidade ou efeitos colaterais (LEACH, 2004; RAINA *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do complexo natural altamente diluído M1, administrado topicamente em forma de gel, sobre o processo de cicatrização da pele em camundongos utilizando dois modelos, o de incisão suturada com fio absorvível ou não absorvível e o de excisão da pele.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar comparativamente cortes histológicos da pele de camundongos controles e tratados após **incisão e sutura com fio absorvível e não absorvível**, verificando o fechamento da ferida através da reepitelialização e migração do tecido conjuntivo após coloração com Tricrômico de Gomori;
- Comparar a velocidade de fechamento da ferida após a **excisão** de porções circulares de pele em camundongos controles e tratados através de medições da área aberta da ferida ao longo de dez dias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no âmbito do Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas, situado no Departamento de Biologia Celular, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

PREPARAÇÃO DO COMPLEXO M1

A preparação de soluções altamente diluídas geralmente parte de um extrato integral, também chamado de tintura-mãe (TM), ou de diluições decimais (dH, sendo que o “d” significa *decimal* e o “H” *Hahnemanniana*) de um composto. As tinturas iniciais passam então por diluições decimais seriadas em água destilada, isto é, 1 parte da tintura para 9 de água destilada (v/v), seguida de outra diluição de 1 parte da solução obtida anteriormente para 9 partes de água destilada, e assim sucessivamente até que se obtenha o produto final desejado, cuja denominação será seguida de um número mais dH (potência), onde o número corresponde a quantas diluições decimais foram feitas. As diluições podem também ser de ordem centesimal, neste caso 1 parte da tintura para 99 de água destilada, e o número final é então seguido de cH. Entre cada diluição a solução é agitada vigorosamente por 100 batidas fortes contra um aparato macio, processo este denominado sucussão/dinamização (OLIVEIRA, DE *et al.*, 2011).

Os complexos naturais altamente diluídos também seguem as técnicas de preparação Hahnemannianas utilizadas para os compostos, de acordo com as normas de manipulação da Farmacopeia Homeopática Brasileira (“Farmacopeia Homeopática Brasileira,” 2011), com diluições sucessivas intercaladas por sucussão/dinamização. As tinturas-mãe são adquiridas de agências autorizadas e licenciadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de modo a assegurar a qualidade e a composição físico-química dos produtos. Os géis utilizados nesse trabalho foram manipulados e obtidos da Farmácia de Manipulação Homeoterápica de Curitiba (<http://www.homeoterapica.com.br/>).

No presente trabalho foi utilizado um complexo natural altamente diluído denominado M1, que contém 15 compostos de origem vegetal, animal e mineral, e cuja composição está descrita na Tabela 1. O gel utilizado como veículo de diluição

é composto por base cosmética aniônica de carbopol (VIA FARMA, Fab. CASA SIENA, Lote: 28383) à qual foi adicionado 10% (m/m) do complexo natural altamente diluído M1 já na sua diluição final após sucussão. O gel utilizado como veículo foi usado como controle do tratamento.

Tabela 1. COMPOSIÇÃO DO COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO M1.

ORIGEM DOS COMPONENTES	COMPONENTES	MATRIZ	CONCENTRAÇÃO FINAL	
			POTÊNCIA	V/V (%)
Vegetal	<i>Aconitum napellus</i>	TM	20 dH	0.1×10^{-19}
Mineral	<i>Arsenicum album</i>	6 dH	18 dH	0.1×10^{-17}
Vegetal	<i>Asa foetida</i>	TM	20 dH	0.1×10^{-19}
Animal	<i>Calcarea carbonica</i>	8 dH	16 dH	0.1×10^{-15}
Vegetal	<i>Chelidonium majus</i>	TM	20 dH	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Cinnamon</i>	TM	20 dH	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Conium maculatum</i>	5 dH	17 dH	0.1×10^{-16}
Vegetal	<i>Echinacea purpurea</i>	TM	20 dH	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Gelsemium sempervirens</i>	TM	20 dH	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Ipecacuanha</i>	5 dH	13 dH	0.1×10^{-12}
Mineral	<i>Phosphorus</i>	12 dH	20 dH	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Rhus toxicodendron</i>	6 dH	17 dH	0.1×10^{-16}
Mineral	<i>Silicea</i>	12 dH	20 dH	0.1×10^{-19}
Mineral	<i>Sulphur</i>	12 dH	24 dH	0.1×10^{-23}
Vegetal	<i>Thuja occidentalis</i>	6 dH	19 dH	0.1×10^{-18}

Os componentes de origem vegetal encontram-se destacados em verde, animal em vermelho e os de origem mineral em azul. TM = tintura mãe (Adaptado de DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

ANIMAIS

A manipulação dos animais foi realizada após treinamento pessoal através de curso específico. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os certificados encontram-se em anexo.

Foram usados camundongos albinos suíços, da espécie *Mus musculus*, machos, com idade aproximada de 2 meses, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério, durante o período experimental com água e ração *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 h.

O protocolo experimental deste trabalho foi dividido em duas partes, que representam dois modelos diferentes utilizados para o estudo do fechamento da ferida durante o processo de cicatrização da pele, conforme esquematizado a seguir (Figura 3) e explicado na sequência.

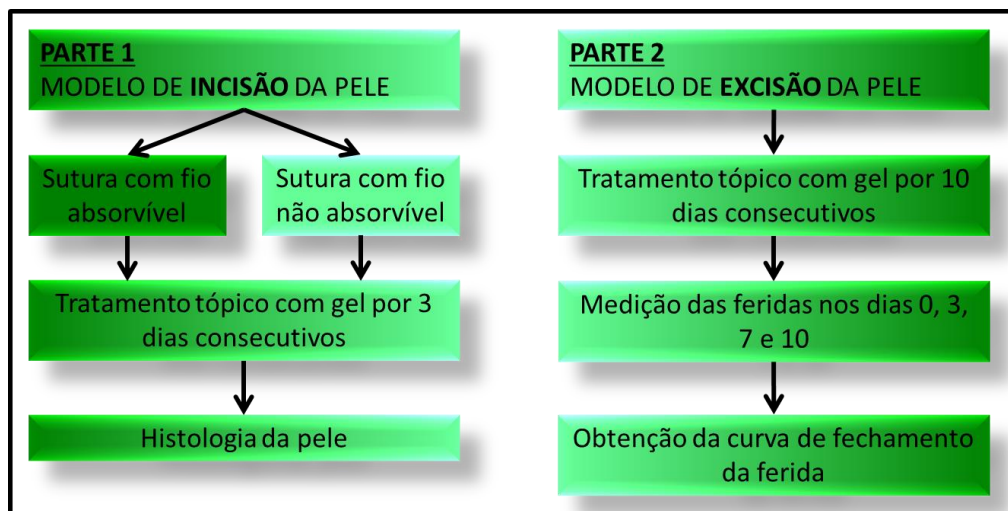


Figura 3. Esquema do protocolo experimental.

PARTE 1 - MODELO DE INCISÃO E SUTURA DA PELE

Os animais foram pesados no dia do experimento e posteriormente anestesiados intraperitonealmente com 67-100 mg/kg de cloridrato de cetamina (VETNIL) e 13-20 mg/kg de cloridrato de xilazina (SYNTEC) diluídos em soro fisiológico estéril. Após terem adormecido, os animais tiveram as costas depiladas manualmente (arrancando os pelos) e então limpas com etanol 70%, fazendo a assepsia da região.

Com bisturi número 15 foi feito um corte de aproximadamente 1 cm de comprimento abrangendo toda a espessura da pele (epiderme, derme e hipoderme).

A incisão foi suturada com 3 pontos (1 nó e dois sobre nós) utilizando fio de sutura absorvível 5-0 (ETHICON, Johnson & Johnson) (Figura 4) ou fio de seda trançada não absorvível 4-0 (ETHICON, Johnson & Johnson), a fim de comparar a resposta inflamatória, uma vez que é esperada uma maior inflamação quando utilizado o fio de sutura absorvível. Os animais se recuperaram da anestesia em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum* e sob ambiente aquecido a aproximadamente 22°C por ar condicionado quente para que mantivessem a temperatura corpórea.



Figura 4. Modelo de incisão e sutura da pele. Imagem representativa de um camundongo após incisão e sutura da pele com fio absorvível.

Os animais após a cirurgia foram divididos nos seguintes grupos: “sham” (sem tratamento); “controle” (tratado com o gel utilizado como veículo para diluição do complexo natural altamente diluído M1); e “M1” (tratado com gel contendo M1). As lesões foram tratadas ou não logo após a cirurgia com aproximadamente 180 mg/cm² de veículo ou M1 por 3 dias consecutivos. O tratamento foi repetido a cada 24 h por 3 dias consecutivos.

É importante ressaltar que os grupos foram divididos randomicamente e os tratamentos foram feitos de maneira controlada e cega, uma vez que os produtos utilizados foram codificados por pessoas não relacionadas ao estudo. Isso vale também para a parte 2 deste trabalho.

Após o período experimental de 3 dias os animais foram anestesiados da mesma forma descrita para o dia da cirurgia e mortos por deslocamento cervical. A pele no local da incisão foi umedecida com água destilada para facilitar a retirada dos pontos, esses foram então cortados com tesoura e retirados delicadamente para não danificar o tecido. Parte do fio absorvível ficou aderido ao tecido, nesses casos foi cortada apenas a parte externa dos pontos. Foi recortado um retângulo de pele

contendo o local da lesão, o qual foi esticado sobre papel filtro umedecido com água destilada para que permanecesse plano ao longo do processamento histológico, pois no modelo de incisão o fechamento da ferida foi avaliado através dos cortes histológicos.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

A pele extraída no último dia de cada experimento foi processada de acordo com protocolo de rotina para coloração histológica. Resumidamente, a pele passou por processos de fixação em Bouin (na proporção de aproximadamente 10 vezes o volume de fixador em relação ao tecido), desidratação em bateria de concentração crescente de etanol, inclusão em parafina, cortes de 3µm de espessura em micrótomo (American Optical) e coloração com solução de Gomori por 1 h. Os protocolos detalhados encontram-se em anexo.

PARTE 2 - MODELO DE EXCIÇÃO DA PELE

Os animais foram anestesiados da mesma forma descrita na parte 1 desse trabalho. Após adormecidos, os animais foram posicionados sobre uma bolsa térmica de gel aquecida, tiveram as costas tricotomizadas com máquina de barbear e o restante dos pelos foi removido com creme depilatório (VEET). A assepsia do local foi feita com etanol 70%. Foram então feitas duas feridas circulares de 6 mm de diâmetro, com distância de aproximadamente 2 cm uma da outra (Figura 5). Escolhemos fazer duas feridas por animal com o objetivo de aumentar a quantidade de amostra e reduzir os erros estatísticos ao final dos experimentos. Os animais se recuperaram da anestesia sob lâmpada incandescente para que mantivessem a temperatura corporal. Posteriormente, foram alojados em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*.



Figura 5. Modelo de excisão da pele. Imagem representativa de um camundongo após excisão de duas porções circulares da pele com 6mm de diâmetro.

Após a cirurgia, os animais foram divididos nos grupos experimentais sham, controle e M1, como descrito anteriormente. As lesões foram tratadas, ou não, logo após a cirurgia sendo repetido a cada 24 h com aproximadamente 180 mg/ferida de veículo ou M1, com auxílio de hastes flexíveis plásticas com algodão na ponta (Cotonete, Johnson & Johnson) para não machucar os animais, durante 10 dias consecutivos. O mesmo tratamento era aplicado às duas feridas de cada animal.

Ao longo do período experimental (até dez dias) a área aberta de cada ferida foi medida em triplicata circulando as bordas da ferida com caneta de retroprojeto sobre folha de acetato (Figura 6) nos dias 0, 3, 7 e 10 após indução das feridas, a fim de se obter a curva de fechamento da ferida.

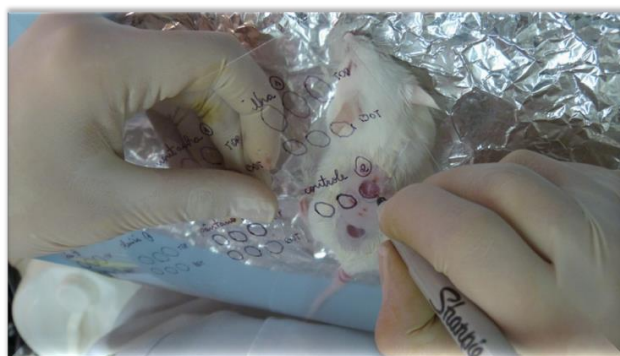


Figura 6. Delimitação da área da excisão. Imagem representativa da metodologia utilizada para medir a área aberta de cada ferida no modelo de excisão da pele.

As feridas foram também fotografadas no primeiro e último dia do período experimental a fim de ilustrar o fechamento. Para isso, foi posicionado sobre a pele do animal um aparato de papel com um recorte quadrado e então fotografada a região contendo a ferida. Dessa forma, foi possível recortar porções de mesmo tamanho das imagens, possibilitando a comparação do tamanho das feridas (Figura 7).

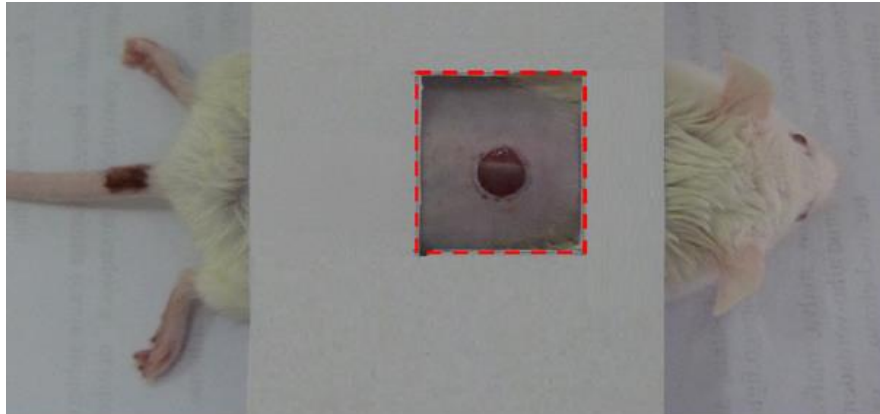


Figura 7. Fotografia da área aberta da ferida. Imagem representativa da metodologia utilizada para fotografar a área aberta de cada ferida no modelo de excisão da pele. A região demarcada pela linha tracejada vermelha foi recortada das fotografias para montar uma prancha comparativa.

Após o período experimental de 10 dias os animais foram anestesiados da mesma forma descrita para o dia da cirurgia e mortos por deslocamento cervical após a medição e fotografia de cada ferida.

OBS: a casca das feridas não foi removida, porém se destacou sozinha em alguns animais após 10 dias de experimento.

ANÁLISES DE IMAGENS

Área da epiderme e do tecido conjuntivo – modelo de incisão na pele

As lâminas foram observadas e as imagens obtidas no microscópio motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE) equipado com um digitalizador VSlide (Metasystems, Altlußheim, DE), utilizando a objetiva de 20 vezes. Posteriormente, foram obtidas fotografias de cada corte histológico no aumento digital de 30 vezes com o local da incisão centralizado.

Utilizando o programa ImageJ, foi medida a área da epiderme e do tecido conjuntivo subjacente em cada um dos 3 cortes de pele de cada animal corados com

Tricrômico de Gomori, com raio de 1,17 mm a partir do centro da lesão (Figura 8), representando 3 locais diferentes da extensão da incisão, como esquematizado no anexo 1.

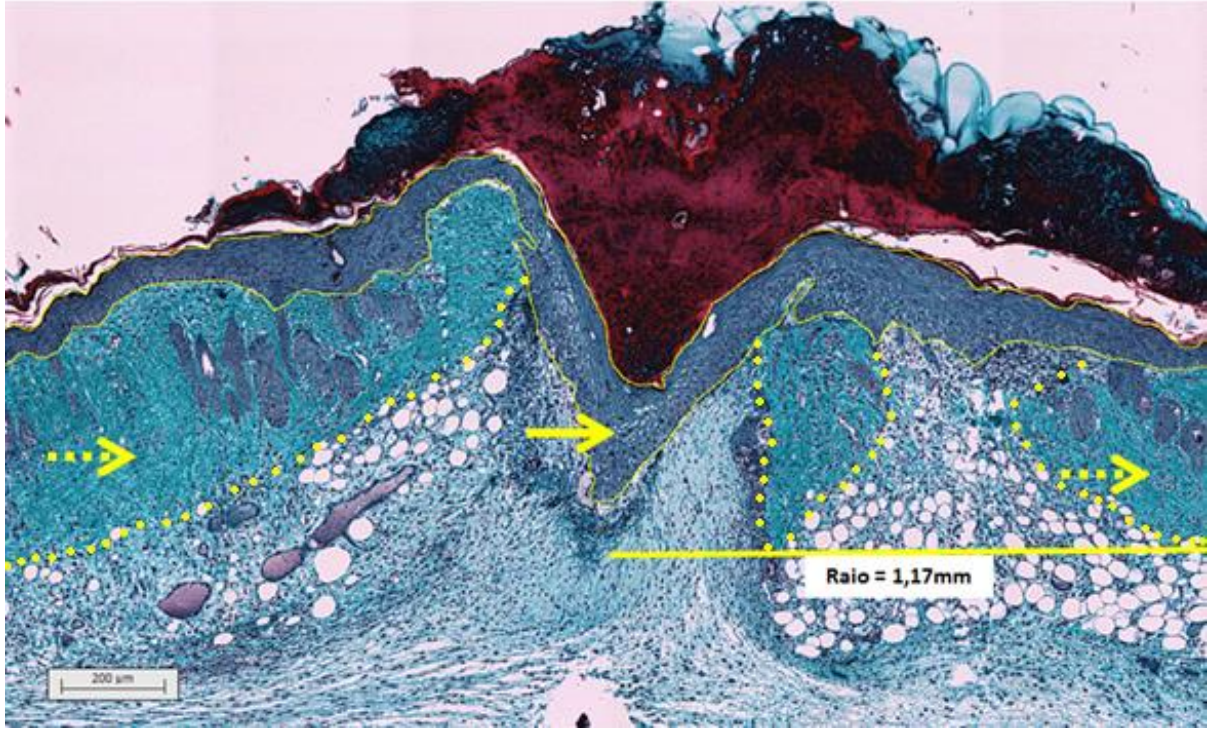


Figura 8. Análise da pele através de software ImageJ. Imagem representativa esquematizando a análise feita nas imagens de cortes histológicos do modelo de incisão da pele corados com Tricrômico de Gomori. A seta central aponta a região corada em roxo e circulado por linha amarela fina, a qual representa a epiderme. As setas laterais pontilhadas apontam as regiões coradas em verde e circuladas por linha pontilhada amarela, que representam o tecido conjuntivo. Áreas descontínuas de epiderme e tecido conjuntivo foram somadas a fim de obter a área total de cada tecido no mesmo corte. Glândulas e folículos pilosos (regiões coradas em roxo dentro dos limites do tecido conjuntivo) foram considerados parte do tecido conjuntivo. Aumento digital = 30 x, escala = 200 µm.

Determinação da área aberta das feridas – modelo de excisão da pele

As folhas de acetato contendo as medições das feridas foram digitalizadas em impressora HP Deskjet F300 Series no formato JPEG com resolução de 600 DPI, na presença de uma régua utilizada como escala. Utilizando o programa ImageJ, foi determinada a área aberta de cada ferida circulando-as manualmente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada grupo de tratamento consistiu de 4-9 repetições/animais. Para os experimentos de incisão e sutura, foi feita a média dos dados obtidos dos cortes de cada animal e posteriormente a média de cada grupo de tratamento. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (média \pm EPM) sendo considerados estatisticamente significativos os valores comparados com nível de significância de $p \leq 0,05$.

No caso do modelo de excisão, foi calculada a média das 3 medidas de cada ferida nos dias 0, 3, 7 e 10. A área aberta de cada ferida foi determinada relativamente à área aberta inicial (dia 0) da mesma utilizando a seguinte fórmula: *Porcentagem do tamanho da ferida inicial = (tamanho da ferida no dia "x" em mm² X 100 / tamanho da ferida no dia "0" em mm²)*. Posteriormente, foi calculada a média para as duas feridas de cada animal e então feita uma média para cada grupo de tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste t. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (média \pm EPM) sendo considerados estatisticamente significativos os valores comparados com nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fechamento da epiderme o mais rápido possível após uma lesão é muito importante, pois a pele precisa ser reparada para que possa manter sua função e assegurar a sobrevivência do indivíduo (CARTER et al., 2003; DELAVARY et al., 2011). Isso se dá pela chegada de queratinócitos na ferida, seguida de sua proliferação em direção ao centro da lesão, isolando-a do ambiente externo e prevenindo a dessecação do tecido e infecção por organismos patogênicos. Enquanto isso, a restauração do tecido conjuntivo se dá pela diferenciação de miofibroblastos, os quais, com seus filamentos contráteis tem a capacidade de aproximar as margens da ferida, refazendo o tecido subjacente à epiderme (AMADEU et al., 2008).

Pensando nisso, nesse trabalho fomos investigar os possíveis efeitos de um complexo natural altamente diluído (M1), conhecido por ativar o sistema imunitário, na cicatrização da pele de camundongos. Dois modelos foram utilizados, e os resultados são descritos a seguir.

PARTE 1 - MODELO DE INCISÃO SUTURADA

Primeiramente, utilizamos o modelo de incisão da pele seguida de sutura, a fim de avaliar se o complexo natural altamente diluído M1 apresentava efeitos sobre o processo de cicatrização da pele, uma vez que esse modelo já havia sido empregado em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (DIETER, 2005).

Macroscopicamente, não foi verificada diferença evidente na aparência externa das lesões quando comparados os diferentes grupos após 3 dias de tratamento, e também quando comparados os diferentes fios de sutura. Foi observada uma grande diferença entre os animais, uma vez que o fechamento da ferida e a qualidade da cicatrização variaram de acordo com a forma que os pontos eram feitos. Isto é, apesar de as suturas terem sido realizadas pela mesma pessoa em todos os animais, o fato de alguns pontos ficarem pouco mais apertados ou pouco mais frouxos do que outros fez com que houvesse sobreposição das margens da pele em alguns locais ou aproximação insuficiente das mesmas, promovendo muitas vezes cicatrização diferenciada em pontos distintos de uma mesma incisão, o que refletiu para o conjunto dos animais, dificultando as análises.

A fim de determinar o fechamento das feridas, os cortes histológicos da pele corados com Tricrômico de Gomori, que cora diferencialmente a derme da epiderme (azul esverdeado e roxo, respectivamente), foram observados no aumento de 30 vezes com o local da incisão centralizado (Figura 9).

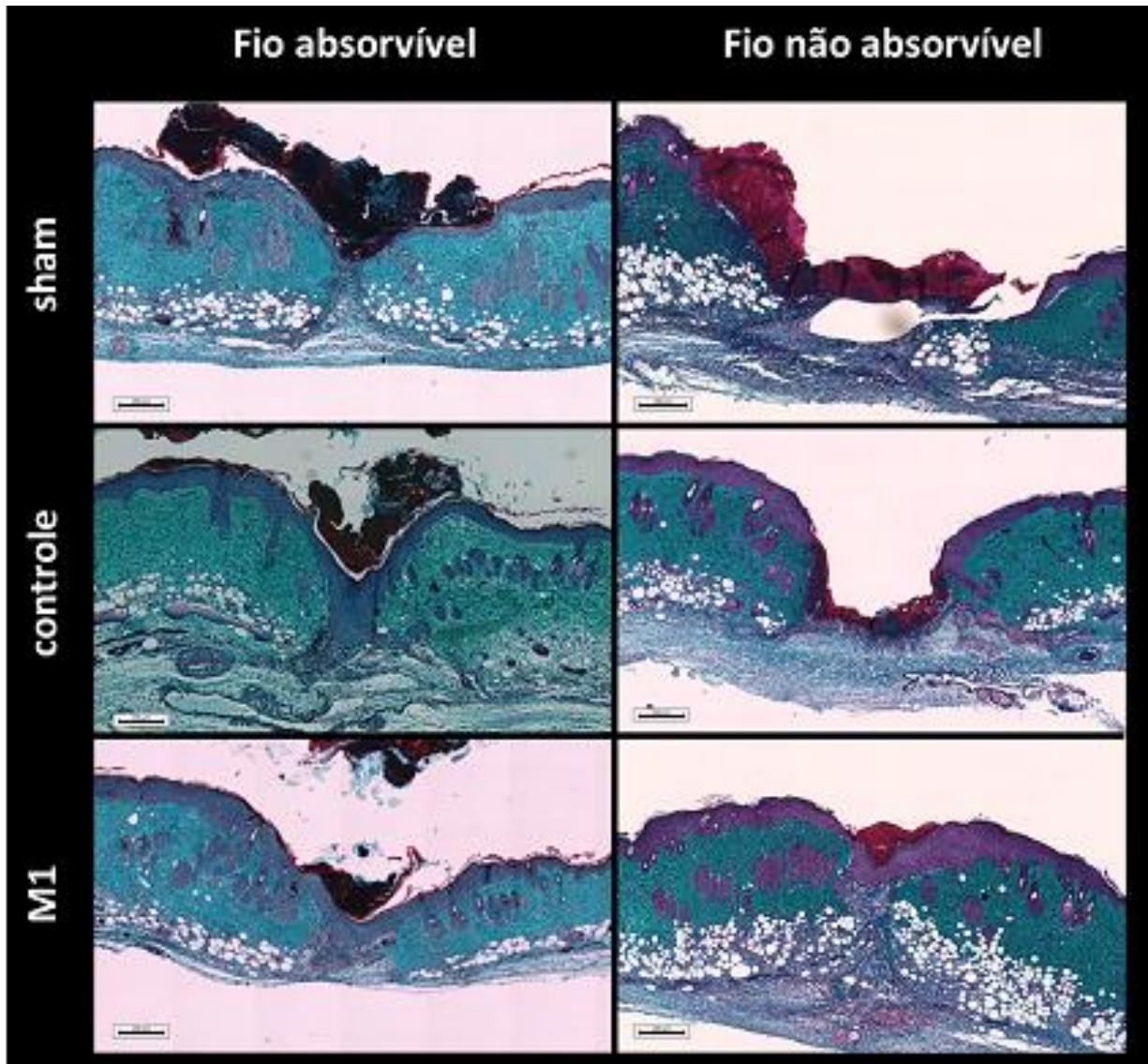


Figura 9. Análise histológica da pele após incisão e sutura. Prancha comparativa das imagens de cortes histológicos da pele de camundongos corados com tricrômico de Gomori após incisão e sutura com fio absorvível ou não absorvível e tratamento com gel (veículo ou M1) ou não (sham) por 3 dias consecutivos. As imagens foram feitas com o local da incisão centralizado. As regiões coradas em roxo representam a epiderme e as regiões coradas em verde azulado representam o tecido conjuntivo. Aumento digital = 30 x, escala = 200 µm.

A região da pele contendo a incisão foi dividida em três partes durante o processamento histológico a fim de obter cortes que compreendessem diferentes

locais da mesma lesão (vide protocolo em anexo). Os cortes histológicos feitos em diferentes locais da mesma incisão apresentaram diferentes padrões de fechamento da lesão, dificultando a avaliação apenas visual dos cortes, portanto foi calculada a porcentagem dos cortes de cada grupo de tratamento que apresentou fechamento completo da epiderme (Tabela 2).

Tabela 2. COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE CORTES HISTOLÓGICOS QUE APRESENTARAM EPIDERMIS COMPLETAMENTE FECHADA NOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMENTO E TIPOS DE SUTURA.

Porcentagem dos cortes analisados que apresentaram a epiderme completamente fechada (número de cortes analisados)		
	Fio absorvível	Fio não absorvível
sham	58,33 (12)	20 (5)
controle	61,54 (13)	42,86 (7)
M1	64,28 (14)	100 (5)

Os cortes com epiderme fechada para os animais suturados com fio absorvível mostraram-se relativamente homogêneos entre os grupos de tratamento. Porém, para os suturados com fio não absorvível obteve-se um aumento de aproximadamente 2,14 x no controle com relação ao sham, e de 2,33 x quando comparamos M1 com controle, mostrando um indício de efeito não só do gel, como também do tratamento com M1 sobre a cicatrização nesse modelo. No entanto, vale lembrar que o número de cortes avaliados desse último grupo foi em média a metade do que do grupo “fio absorvível”.

Após este panorama inicial, decidimos quantificar o montante de tecido de regeneração produzido após 3 dias de tratamento em cada corte histológico, o que foi feito através da medida das áreas de epiderme e tecido conjuntivo (derme) utilizando o programa ImageJ. Ao contrário do que indicava o resultado inicial da quantificação dos cortes com epiderme fechada, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e M1 no que diz respeito à área da epiderme e do tecido conjuntivo nos cortes histológicos para ambos os fios de sutura utilizados (Figura 10).

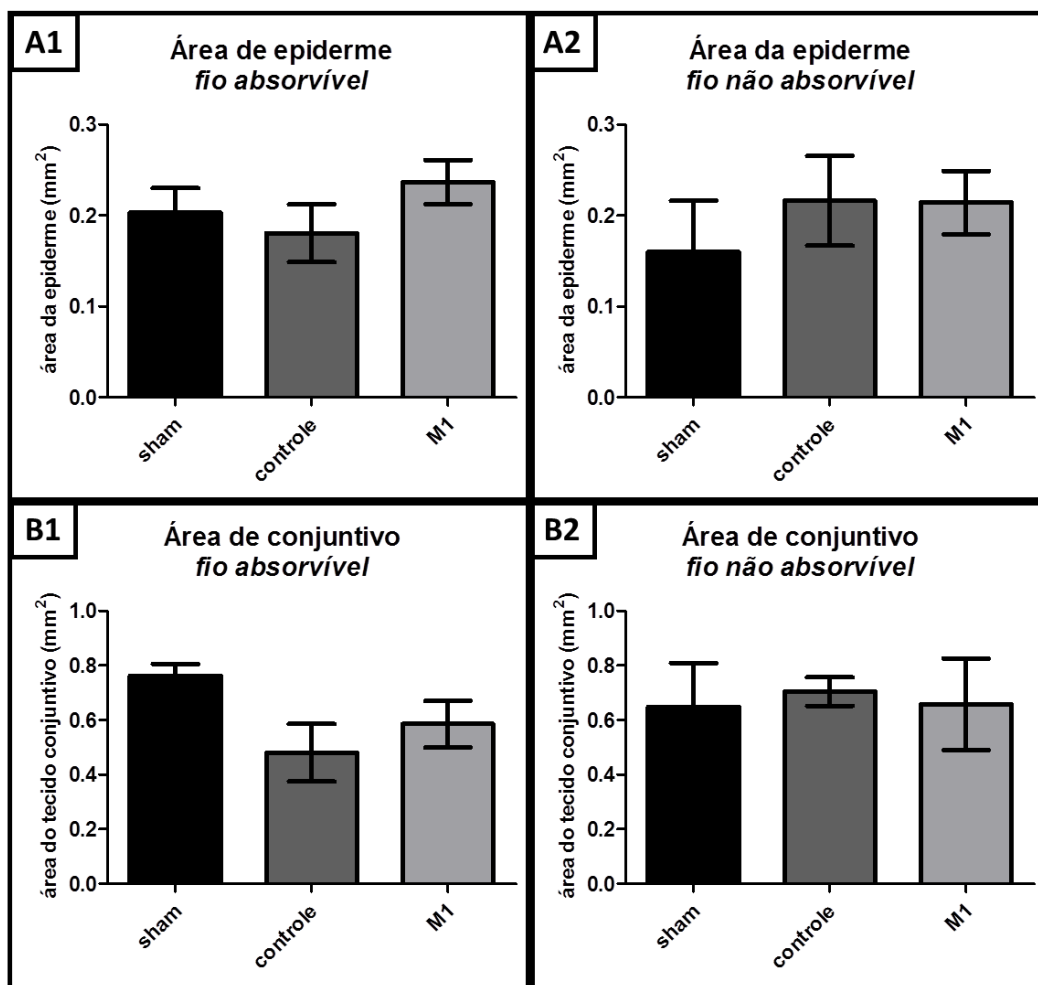


Figura 10. Medidas da pele após os ensaios de incisão e sutura. Medidas de área da epiderme (A) e do tecido conjuntivo (B) em cortes histológicos de pele após incisão e sutura com fio absorvível (1) e não absorvível (2) e tratamento de 3 dias com complexo natural altamente diluído. As medidas das áreas de epiderme e tecido conjuntivo em mm² foram obtidas utilizando o programa ImageJ.

Patil *et al.* (2012) utilizaram o modelo de incisão suturada da pele para o estudo dos efeitos de extrato alcoólico de *Daucus carota* na cicatrização da pele em ratos. Para tal, fizeram duas incisões longitudinais na pele paralelamente à coluna vertebral com 6 cm de comprimento cada, ambas suturadas com 3 pontos utilizando fio não absorvível. Nesse trabalho, os autores não mencionaram problemas na análise histológica devidos à não uniformidade dos pontos de sutura (PATIL *et al.*, 2012).

Em 2011, Thakur *et al.* publicaram uma revisão bastante detalhada sobre as metodologias utilizadas atualmente para o estudo da cicatrização da pele, mostrando que 28% dos trabalhos publicados nessa área utilizam o modelo de incisão suturada da pele, onde em geral são feitas duas incisões paralelas à coluna vertebral de 4 a 6 cm de comprimento no dorso dos camundongos, as quais são

posteriormente suturadas com intervalos de 0,5 a 1 cm entre os pontos (THAKUR *et al.*, 2011). A distância sugerida entre os pontos é maior do que a que nós utilizamos no presente trabalho, sendo uma possível razão da não uniformidade vista na histologia, uma vez que se os pontos forem feitos com maior distância uns dos outros é possível selecionar para a histologia apenas as regiões mais distantes do local da sutura, evitando visualizar as irregularidades observadas histologicamente em locais muito próximos à sutura.

Muitos trabalhos utilizam o modelo de incisão na pele a fim de verificar a resistência da ferida à tração e não propriamente avaliar o fechamento da ferida (FIKRU *et al.*, 2012; GÜVENÇ *et al.*, 2012; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2013). Mekonnen *et al.* (2013), por exemplo, utilizaram o modelo de incisão e sutura para testar a resistência da ferida à tensão após 9 dias de tratamentos, enquanto que o fechamento da ferida foi analisado através do modelo de excisão da pele, o qual foi empregado da mesma maneira como no nosso trabalho. Portanto, verificar a resistência da ferida após incisão e tratamento com M1 é algo a se considerar em experimentos futuros, uma vez que está diretamente relacionada à quantidade e qualidade da produção de fibras colágenas durante o processo de fechamento da ferida, permitindo que as margens da lesão permaneçam unidas após o término da cicatrização (MEKONNEN *et al.*, 2013).

Assim, após a realização desse modelo de estudo verificamos que a metodologia empregada não foi a ideal para estudos de efeitos de tratamentos sobre o fechamento de feridas, uma vez que as incisões cicatrizam de forma muito diferente de acordo com a proximidade que as duas margens da ferida encontram-se após a amarração com os pontos, mostrando grande diferença entre os cortes após processamento histológico e dificultando a análise de fechamento da ferida.

Dessa forma, decidimos utilizar outro modelo, o de excisão da pele, que é utilizado em 49% dos trabalhos relacionados à cicatrização da pele (THAKUR *et al.*, 2011). Nesse são feitas feridas circulares na pele do dorso dos animais, sendo possível acompanhar com maior precisão a taxa de fechamento das feridas ao longo do tempo através da medição direta do tamanho de cada ferida.

PARTE 2 - MODELO DE EXCISÃO DA PELE

Nesse segundo modelo, o mais utilizado para o estudo de cicatrização da pele, foram feitas duas feridas circulares no dorso dos camundongos, com aproximadamente 6 mm de diâmetro, cujo fechamento foi acompanhado através da medida do tamanho de cada ferida ao longo do período experimental, até 10 dias, e comparação com o tamanho inicial, no dia 0.

Não foram observadas visualmente diferenças no tamanho das feridas (Figura 11). E também não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e M1 ao longo do período de avaliação no que diz respeito à velocidade de fechamento da ferida (Figura 12).

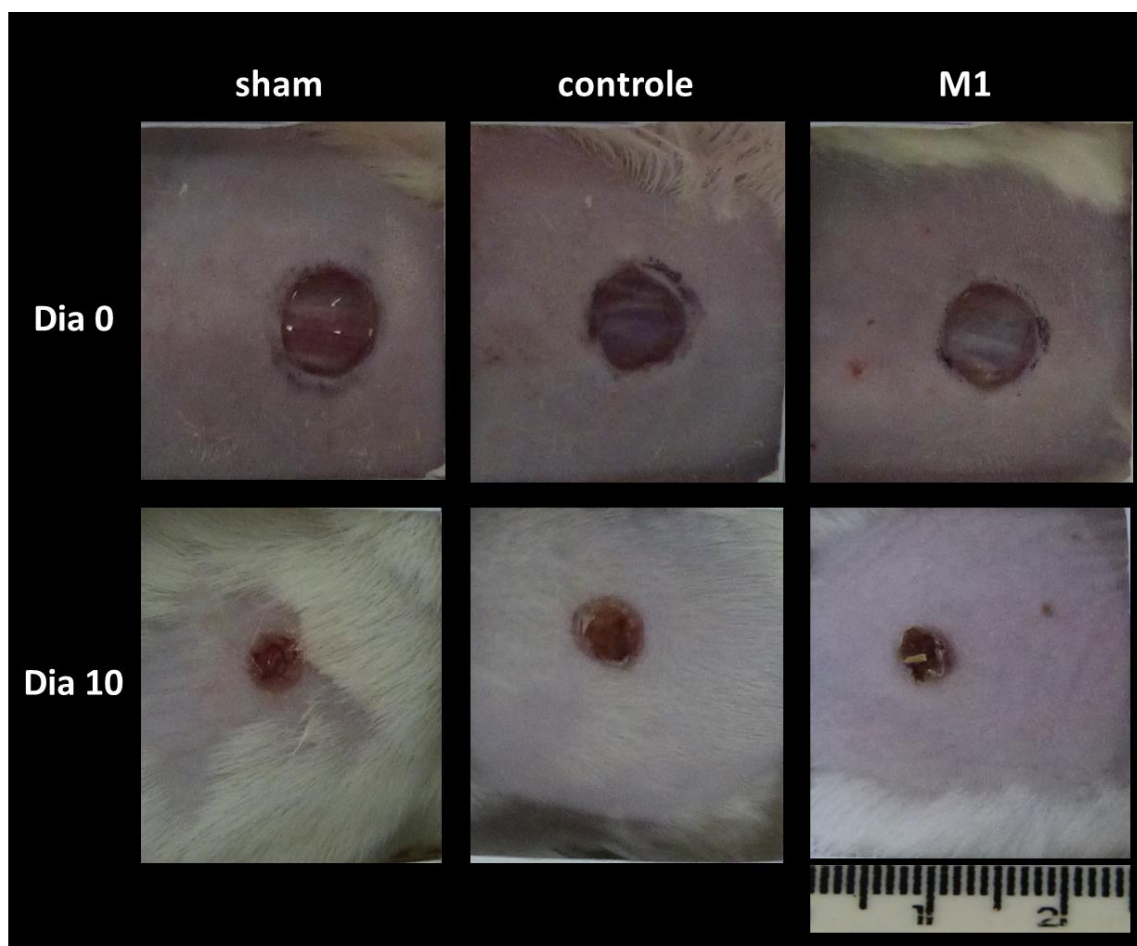


Figura 11. Ferida aberta após excisão da pele. Prancha comparativa da área aberta das feridas após excisão de porções circulares de 6 mm de diâmetro da pele. As feridas foram tratadas com M1 ou veículo (controle) por 10 dias consecutivos. As imagens apresentam a mesma escala.

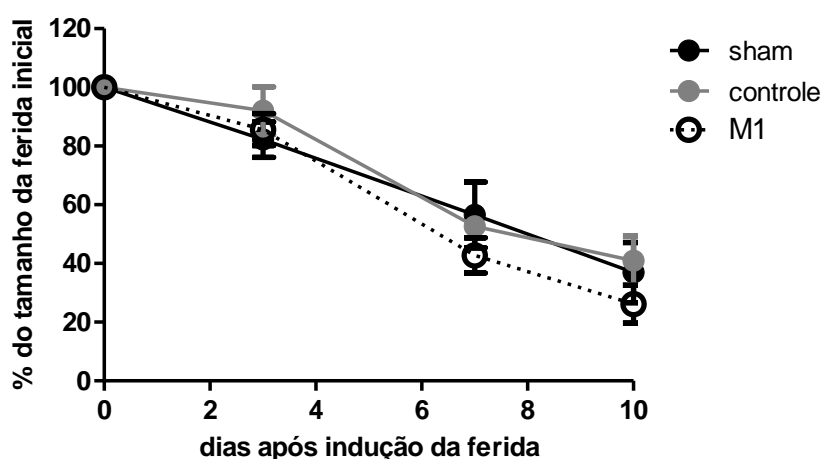


Figura 12. Fechamento da ferida após excisão da pele. As feridas foram tratadas com M1 ou veículo (controle) por 10 dias consecutivos, medidas nos dias 3, 7 e 10 e posteriormente comparadas à sua medida inicial, no dia 0.

A cicatrização depende primeiramente da habilidade de reparo do tecido, e complementarmente ao tipo e gravidade da lesão. Quando ocorre uma lesão aberta o tecido fica obviamente mais exposto ao contato com o ambiente externo e conseqüentemente a possíveis ataques por microrganismos patogênicos do que em lesões não abertas (PATIL *et al.*, 2012). Esse contato com microrganismos desencadeia uma resposta inflamatória com produção de moléculas oxidantes capazes de causar danos celulares, o que pode tornar lento o processo de cicatrização no modelo de excisão da pele, apesar de não terem sido observados sinais evidentes de infecção nas feridas ao longo do período experimental. O desencadeamento de resposta inflamatória aguda também ocorre quando suturamos uma incisão com fio absorvível, uma vez que o organismo precisa digerir-lo. No nosso estudo verificamos que o M1 mostrou efeito benéfico sobre o processo de cicatrização apenas no modelo de incisão suturada com fio não absorvível, onde não é esperado processo de inflamação aguda. Dessa forma, podemos supor que aparentemente, o complexo M1 não apresenta efeito anti-inflamatório durante a cicatrização da pele e que seu efeito, quando da sutura com fio não absorvível, se deu por outra via como a estimulação da proliferação dos queratinócitos da epiderme, por exemplo.

Estudos mostram que a manutenção da umidade na ferida aberta mantém as células viáveis, permitindo a liberação de fatores de crescimento e modulando sua

proliferação. Além disto, a hidratação da superfície permite absorção mais rápida de medicações aplicadas topicamente e favorece reações enzimáticas dependentes de água, como no caso das reações de debridamento, isto é, da remoção do tecido desvitalizado presente na ferida (FIELD; KERSTEIN, 1994).

Neste trabalho nós optamos por utilizar uma base cosmética na forma de gel como veículo de diluição do complexo natural altamente diluído M1, como o objetivo de manter a humidade sobre a ferida por certo tempo, a fim de promover a completa absorção do M1 pelo tecido. A difusão de soluções aquosas (no caso, o M1) de formulações a base de gel para o tecido ocorre através da fase aquosa, oferecendo boa difusão e liberação da solução para o tecido alvo (MALIPEDDI *et al.*, 2006). De fato o gel de Carbopol é capaz de aumentar o tempo de exposição e consequentemente a disponibilidade da solução aquosa do complexo M1 no tecido, uma vez que é um carbômero, isto é, um polímero hidrossolúvel na forma de gel, que possui grupos carboxil que se ligam aos oligossacarídeos presentes nas membranas celulares, tornando-o bastante adesivo (GONJARI *et al.*, 2010). Porém, devido a essa característica adesiva, o gel de carbopol pode formar um fino filme gelatinoso sobre a ferida, o que pode atrapalhar a migração celular durante o fechamento da ferida.

Dessa forma, como não foram obtidos resultados significativamente positivos da aplicação do complexo M1 administrado topicamente na forma de gel sobre feridas em cicatrização, futuramente utilizaremos base cosmética de creme como veículo para diluição do complexo M1, a fim de obter completa absorção tanto do complexo quanto do veículo. As análises histológicas serão feitas a partir de material coletado das feridas do modelo de excisão, uma vez que a cicatrização se dá de forma homogênea em toda a borda de uma ferida circular, fazendo necessária a observação de apenas uma pequena porção de cada ferida.

Estudos mostram que o óxido nítrico tem efeito antimicrobiano e estimulante da cicatrização (NEIDRAUER *et al.*, 2013) através da estimulação da proliferação de queratinócitos (SPALLOTTA *et al.*, 2013). O TNF- α pode ter efeitos inibitórios do reparo tecidual, diminuição da produção de colágeno *in vivo* e *in vitro* (RAPALA, 1996). Animais *knockout* para IFN- γ mostraram fechamento da ferida e formação de tecido de granulação mais rápido, aumento da angiogênese e deposição acelerada

de colágeno quando comparados a animais selvagens (ISHIDA *et al.*, 2004). Dessa forma, apesar de não terem sido obtidos resultados positivos até agora a respeito dos efeitos do M1 sobre a cicatrização da pele, prosseguiremos com os estudos, uma vez que sabemos da sua ação como modulador da resposta imunológica, elevando a liberação de óxido nítrico e modulando a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) pelos macrófagos. Futuramente, serão também realizados testes *in vitro* a fim de verificar possíveis efeitos do M1 diretamente sobre células da pele, como fibroblastos e queratinócitos, por exemplo.

5. CONCLUSÕES

- O tratamento com o complexo natural altamente diluído (M1) na forma de gel não alterou significativamente o fechamento da epiderme e do tecido conjuntivo subjacente no modelo de incisão e sutura da pele.
- A metodologia empregada no modelo de incisão e sutura não foi a ideal para o estudo do processo de cicatrização da pele em camundongos.
- O tratamento com o complexo natural altamente diluído (M1) na forma de gel não alterou significativamente a velocidade de fechamento da ferida no modelo de excisão da pele.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADEU, T. P.; PH, D.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, M. G. DE. Nitric Oxide Donor Improves Healing if Applied on Inflammatory and Proliferative Phase. **Journal of Surgical Research**, v. 93, p. 84 –93, 2008.
- ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Anti-inflammatory, wound healing and in-vivo antioxidant properties of the leaves of *Ficus amplissima* Smith. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 139–145, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123798>>.
- BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.
- BRINKHAUS, B.; WILKENS, J. M.; LÜDTKE, R.; et al. Homeopathic arnica therapy in patients receiving knee surgery: results of three randomised double-blind trials. **Complementary therapies in medicine**, v. 14, n. 4, p. 237–246, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105693>>.
- BURBANO, R. R.; LEAL, M. F.; COSTA, J. B. DA; et al. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. **Homeopathy**, v. 98, n. 1, p. 45–48, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135959>>.
- CARTER, C. A; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E.; HENDREN, D. G.; KANE, C. J. . Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, n. 3, p. 244–255, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014480003000170>>.
- COMBADIÈRE, B.; LIARD, C. Transcutaneous and intradermal vaccination. **Human Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 811–827, 2011.
- DIETER, M. F. **Ação do medicamento CANOVA na cicatrização do dorso de camundongos após incisão e sutura: avaliação macro e microscópica**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.
- EPSTEIN, F. H. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 2, p. 738–746, 1999.
- Farmacopeia Homeopática Brasileira. ., v. 3ª edição, 2011.
- FIELD, C. K.; KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **The american journal of surgery**, v. 167, n. 1, p. 2–6, 1994.

- FIKRU, A.; MAKONNEN, E.; EGUALE, T.; DEBELLA, A.; ABIE MEKONNEN, G. Evaluation of in vivo wound healing activity of methanol extract of *Achyranthes aspera* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 469–474, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771316>>.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, p. 85–97, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cps.2011.09.005>>. .
- GONJARI, I. D.; KARMARKAR, A B.; KHADE, T. S.; HOSMANI, A H.; NAVALE, R. B. Use of factorial design in formulation and evaluation of ophthalmic gels of gatifloxacin: Comparison of different mucoadhesive polymers. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 4, n. 6, p. 423–434, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491308>>. .
- GREENHALGH, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, p. 1019–1030, 1998.
- GÜVENÇ, A.; KÜPELİ AKKOL, E.; SÜNTAR, I.; et al. Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 726–734, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23107822>>.
- ISHIDA, Y.; KONDO, T.; TAKAYASU, T.; IWAKURA, Y.; MUKAIDA, N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. **The Journal of immunology**, v. 172, p. 1848–1855, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734769>>. .
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390–401, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095893>>. .
- LEACH, M. J. A critical review of natural therapies in wound management. **Ostomy wound management**, v. 50, n. 2, p. 36–40, 42, 44–6 passim, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129611>>. .
- LOPES, L.; GODOY, L. M. F.; OLIVEIRA, C. C. DE; et al. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 37, n. 3, p. 277–287, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364649>>.
- MACLEOD, A. S.; HAVRAN, W. L. Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, p. 2399–408, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123394&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- MAHDAVIAN DELAVARY, B.; VEER, W. M. VAN DER; EGMOND, M. VAN; NIESEN, F. B.; BEELLEN, R. H. J. Macrophages in skin injury and repair.

Immunobiology, v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.01.001>>. .

MALIPEDDI, V. R.; DUA, K.; SARA, U. V. S.; MALIPEDDI, H.; AGRAWAL, A. Comparative evaluation of transdermal formulations of norfloxacin with silver sulfadiazine cream, USP, for burn wound healing property. **Journal of burns and wounds**, v. 5, p. 26–31, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1687144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MEKONNEN, A.; SIDAMO, T.; ASRES, K.; ENGIDAWORK, E. In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 638–646, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228912>>.

NEIDRAUER, M.; UK, E.; BHATTACHARYA, A.; et al. Antimicrobial Efficacy and Wound Healing Property of a Topical Ointment Containing Nitric Oxide-Loaded Zeolite . **J Med Microbol.**, v. November, 2013.

NISHIO, N.; ITO, S.; SUZUKI, H.; ISOBE, K. Antibodies to wounded tissue enhance cutaneous wound healing. **Immunology**, v. 128, n. 3, p. 369–80, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

OBERBAUM, M.; MARKOVITS, R.; WEISMAN, Z.; KALINKEVITS, A.; BENTWICH, Z. Wound healing by homeopathic silica dilutions in mice. **Harefuah**, v. 123, n. 3-4, p. 79–82, 156, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1325402>>. .

OBERBAUM, M.; WEISMAN, Z.; KALINKOVICH, A.; BENTWICH, Z. Healing Chronic Wounds Performed on Mouse Ears Using Silica (SiO₂) as a Homeopathic Remedy. **Signals and Images**, p. 191–199, 1997.

OLIVEIRA, C. C. DE; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M. DE; et al. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, p. 101, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3222609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

OLIVEIRA, C. C. DE; OLIVEIRA, S. M. DE; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. D. F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **The Journal of infection**, v. 52, n. 6, p. 420–32, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386798>>.

PATIL, M. V. K.; KANDHARE, A. D.; BHISE, S. D. Pharmacological evaluation of ethanolic extract of *Daucus carota* Linn root formulated cream on wound

- healing using excision and incision wound model. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S646–S655, 2012. Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169112602901>>.
- PREETHI, K. C.; KUTTAN, R. Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 73–80, 2011. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/jbcpp.2009.20.1/jbcpp.2009.20.1.73/jbcpp.2009.20.1.73.xml>>.
- RAINA, R.; PARWEZ, S.; VERMA, P. K.; PANKAJ, N. K. Medicinal Plants and their Role in Wound Healing. **Online Veterinary Journal**, v. 3, n. 1, 2008.
- RAPALA, K. The effect of tumor necrosis factor-alpha on wound healing. An experimental study. **Annales chirurgiae et gynaecologiae. Supplementum**, v. 211, p. 1–53, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790842>>.
- SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental cell research**, v. 304, n. 1, p. 274–86, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707592>>.
- SCHREML, S.; SZEIMIES, R.-M.; PRANTL, L.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866–81, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576319>>.
- SPALLOTTA, F.; CENCIONI, C.; STRAINO, S.; et al. A nitric oxide-dependent cross-talk between class I and III histone deacetylases accelerates skin repair. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 16, p. 11004–11012, 2013.
- THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011, p. 17, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3118986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 37 Suppl 1, p. 5–12, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616753>>.
- WAISSE, S. The science of high dilutions in historical context. **Homeopathy**, v. 101, p. 129–137, 2012.
- WIDELITZ, R. B.; JIANG, T. X.; NOVEEN, A.; et al. Molecular histology in skin appendage morphogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 38, p. 452–465, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9297695>>.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 112–116, 2008.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical clinics of North America**, v. 77, p. 509–528, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194878>>. .

7. ANEXOS

ANEXO 1- PROTOCOLOS PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DA PELE

Fixação, desidratação e inclusão:

- O tecido foi fixado em Bouin* juntamente com o papel filtro por 24 h;
- Foram feitos 2 banhos por dia em álcool 70% (com 4 ml de hidróxido de amônia para cada 1 L de álcool 70%) até que o material ficasse claro;
- Banhos sucessivos de 90 min cada em álcool 70, 80, 90 e 95%;
- 4 banhos de 1 h cada em álcool 100%;
- A pele de cada animal foi cortada em 3 pedaços menores (Figura 1);
- Banho em etanol + xilol (1:1);
- Banho em xilol 100% por 30 minutos;
- Banho em xilol 100% por 20 minutos;
- Banho em xilol 100% por 10 minutos;
- Os fragmentos de pele foram mergulhados em parafina histológica filtrada a 60°C dentro de suportes de metal, em estufa, por 3 h e depois colocados na posição correta para formar os blocos;
- Os suportes foram colocados para esfriar no congelador por 10 min e posteriormente desenhados.

*Solução mãe: 3 partes de solução saturada de ácido pícrico para 1 parte de formol. No momento do uso, prepara-se uma solução com 20 partes de solução mãe + 1 parte de ácido acético glacial.

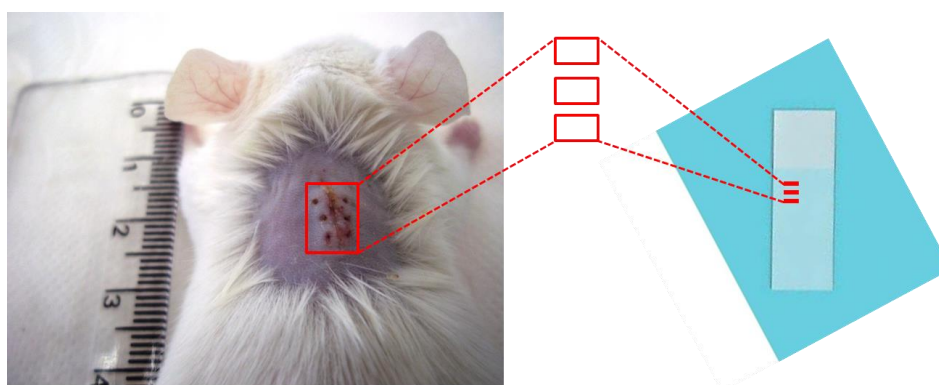


Figura 1. Esquema representativo da segmentação da pele recolhida no local da lesão do modelo de incisão e sutura e o posicionamento dos cortes na lâmina. A pele de cada animal foi cortada em 3 pedaços menores após a desidratação em bateria de concentração crescente de álcool afim de permitir a visualização de diferentes regiões do tecido lesionado.

Cortes:


- Foram feitos cortes de 3 µm de espessura em micrótomo, os quais foram dispostos em lâminas de vidro;
- Aquecimento a 70°C em estufa por 15 min para secar;

Coloração de Tricrômico de Gomori:

- 3 Banhos de xilol por 3 min;
- 3 banhos de etanol por 3 min;
- Água corrente 2 min;
- Hematoxilina de harris 1 min;
- Lavagem com água corrente 2 min;
- Banho com solução 0,001% de hidróxido de amônia;
- Lavagem com água corrente 2 min;
- Lavagem com água deionizada 5 banhos;
- Solução de Gomori** 1 h;
- 4 banhos de etanol por 1 min;
- 3 banhos de xilol por 1 min;
- Montagem com entelan e lamínula.

**0,6 g de Cromotrope 2R; 0,3 g de Fast Green; 1 mL de ácido acético; 0,8 g de ácido fosfotúngstico; 100 mL de água destilada.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE MANIPULAÇÃO ANIMAL

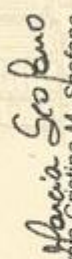

 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
 COORDENADORIA DE EXTENSÃO


Curso de Extensão Universitária

Jenifer Pendiuk Gonçalves frequentou com aproveitamento o Curso de Extensão Universitária **"CURSO TEÓRICO SOBRE TREINAMENTO EM MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL"**, realizado no período de 25 a 28 de março de 2013, num total de 32 horas/aula, conforme o programa no verso, promovido pelo Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Certificado registrado no Livro 45 sob o n.º 288.717, com frequência de 100% e nota 9,5.

Curitiba, 29 de julho de 2013.


 Marília Cristina M. Sbofano
 CHEFE DA UNIDADE DE REGISTRO E CERTIFICAÇÃO


 Nadia Gaiolatto Gonçalves
 COORDENADORIA DE EXTENSÃO

CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

CURSO TEÓRICO SOBRE TREINAMENTO EM MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

PROGRAMA

- Legislação: Estruturas reguladoras da Experimentação Animal (SBCAL, CONCEA, IAP, IBAMA). - Necessidade do curso em experimentação - Certificado de participação, permissão para manipular animais
 - Histórico do Desenvolvimento da Experimentação Animal.
 - Animais de experimentação
 - Padrão sanitário e genético dos animais de laboratório
 - Etologia e experimentação animal
 - Métodos alternativos para substituição de Animais: vantagens e desvantagens (software, manequins, artefatos anatômicos, outros
 - Zoonose: Zoonoses mais frequentes em biotério (vírus, bactéria e parasito) - Biossegurança (cuidados do manipulador)
 - Manipulação de animais: Bem estar animal - Estresse em animais de experimentação - Enriquecimento de ambiente - Técnicas de contenção de animais de laboratório - Vias de inoculação - Vias de coleta de material biológico
 - Anestesia e analgesia para animais de experimentação
 - Formas de eutanásia
 - Ética na pesquisa com peixes: Perspectivas sobre a ciência, dor, medo e estresse em peixes - O uso de peixes em estudos científicos - Princípios éticos nos estudos com peixes - Planejando e executando a pesquisa com ética - Escolha das melhores espécies - Planejamento amostral e experimental - Aquisição de licenças - Obtenção dos organismos - Transporte, aclimação e quarentena - Condições ideais de manutenção dos organismos em laboratório - Anestesia, analgesia e eutanásia.
 - Ética na pesquisa com Animais Silvestres - Fisiopatologia do estresse - Manejo e contenção de animais silvestres - Animais selvagens como modelos experimentais - Possibilidades legais e limites na contenção farmacológica e na eutanásia de animais selvagens
- Programa da aula prática:** Técnicas para a contenção de animais - Marcação dos animais - Vias de inoculação e coleta de sangue - Anatomia dos animais - Obtenção de material biológico - Formas de eutanásia

Coordenador: Prof.^a Márcia Kiyoe Shimada
Vice-Coordenador: Prof. Alexander Roberto Zampronio



Ana Maria Kahan

UNIDADE DE REGISTRO E CERTIFICAÇÃO

ANEXO 3 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA/UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 694

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

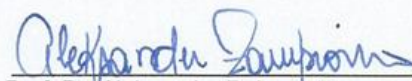
PROCESSO: 23075.020996/2013-24

APROVADO: 20/06/2013 – R.O. 05/2013

TÍTULO: Ação de complexos naturais altamente diluídos no processo de cicatrização de feridas na pele em camundongos

AUTORES: Dorly de Freitas Buchi, Carolina Camargo de Oliveira, Jenifer Pendiuk Gonçalves, Fernando Fortunato Jeronimo, Daniela Moraes Leme, Divino Martins de Oliveira Junior

DEPARTAMENTO: Biologia Celular


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA